中華農業研究 (Jour. Agric. Res. China) 50(1): 54～67 (2001)

以ISSR與RAPD分子標誌分析火鶴花栽培種間遺傳相似性[1]

王昭月[2]　莊耿彰[3]　范明仁[2]

摘要：本研究以農業試驗所『火鶴花育種』計畫中，主要雜交親本 30個栽培種爲材料，探討利用ISSR (inter simple sequence repeat) 及RAPD (random amplified polymorphic DNA) 兩種分子標誌技術進行親本間遺傳相似性之分析與比較其鑑別能力。試驗結果顯示，此兩種分析在火鶴花栽培種間，均表現高度多型性。ISSR分析結果，發現dinucleotides motif : $(TC)_n$ 明顯大量存在於火鶴花基因內，以其作爲引子表現之多型性最高；自篩選得7條引子進行之PCR產物，共可獲153個多型性DNA片段；RAPD分析結果，則自篩選得7條引子反應產生131個多型性片段。此外，ISSR分析產物中發現32個特定的DNA多型性片段，可用以鑑別18個栽培種；而RAPD分析中，則有34個特定的DNA多型性片段，可用以鑑別19個栽培種。進一步將ISSR總產物159個片段，合併進行UPGMA (unweighted pair-group mean arithmetic) 群集分析結果：30個栽培種分成四個主要群組，其中 ‘Southern Blush’、‘Fla-range’ 及‘Lady Anne’ 爲個別獨立的三群，明顯別於第四群組的27個栽培種；連鎖四個群組的30個栽培種，其遺傳相似性係數爲0.53。在RAPD分析方面，其總產物爲134個片段，經合併進行UPGMA分析結果也分成四個主要群組：第一群 ‘Southern Blush’、第二群 ‘Champion’ 及 ‘Marian -Seefurthh’ 及第三群 ‘Midori’ 等四品種，亦明顯相異於第四群組的26個栽培種，連鎖四個群組之遺傳相似性係數則爲0.57。綜合以上兩分析結果顯示，ISSR或RAPD分子標誌，在火鶴花栽培種間遺傳相似性分析之結果相近，兩種分子標誌亦均可利用於鑑別部分栽培種。分子層次之分析結果，可以助益於育種親本遺傳背景之瞭解，對加速優良雜交組合之獲得及提升育種效率，應具實用之價值。

關鍵詞：火鶴花、育種、ISSR 、RAPD 、鑑定、遺傳相似性。

前　　言

火鶴花爲天南星科 (Araceae) 火鶴花屬 (*Anthurium*) 之熱帶花卉，目前全球使用最廣的經濟栽培“種” *A. andraeanum*，早期係由法國植物學家Eduard Andr'e首次於中南美洲的厄瓜多爾及哥倫比亞地區發現[42]。*Anthurium*屬內具有各式色彩華麗的花、葉及果實，深具觀賞價值，據Kamemoto及Kuehnle (1996)[21]分類：火鶴花屬 (*Anthurium*) 涵蓋“種”(species) 數目近1000種，依植株形態及花形之別，通常又細分成18個節 (sections)，其中*Calomystrium*節內的*A. andraeanum*正是目前主要之切花

1.行政院農業委員會農業試驗所研究報告第2058號。

2.本所作物種原室助理研究員、研究員兼主任。臺灣省　臺中縣　霧峰鄉。

3.本所園藝系助理研究員。臺灣省　臺中縣　霧峰鄉。

用種原，其特性爲花型大、切花長度長且直，花朵華麗對稱，花色豐富（原始種之花色本爲橘紅色或紅色，發展至今已新包含有粉紅、鮭紅、白、綠色，褐色、紫色以及混合雙色系等）。另一個 *Porphyrochitonium* 節內的 *A. amnicola*，則具明顯多花性，爲重要之盆花種原[18]。鑑於火鶴花的高經濟觀賞潛力，近代園藝育種學家與大型的花卉種苗公司（如美國的夏威夷大學；荷蘭的Anthura、AVO等）遂紛紛投入育種行列，也因此在短短數十年間，創造出數百個新興優良之栽培品種[16, 17, 42, 44]。

火鶴花性喜高溫多濕，適合台灣氣候栽培，是本省發展中的高產值熱帶花卉之一，唯台灣目前栽培的品種多來自荷蘭，少數則源自美國的夏威夷或佛羅里達地區，引進之火鶴花種原在本省栽培時，除有病蟲害與管理上的困難外，易發生夏季高溫開花不正常以及冬季切花產量不穩之現象。鑑於產業需求，農試所自1989年起著手火鶴花引種及雜交育種工作，旨在開發自有優良品種。育種計畫內的種原，除包含傳統的 *A. andraeanum* 與 *A. amnicola* 外，並逐年自國內外引進新興優良品種，合計目前已收集品種數達90個，其中包含：（一）純色花72品系（二）雙色花10品系（三）新引進種8品系。育種計畫執行迄今，已完成近200個雜交組合，培育三萬多株雜交後裔，並自1996年起開始雜交後代之單株選拔。火鶴花自播種至開花，約須18個月之生長期，傳統田間植物性狀調查之選拔較爲耗時費工，預估至西元2000年後，開花評估之雜交後裔將累積達數萬株以上，屆時除必須繼續進行新雜交組合外，數量龐大的後裔單株選拔工作勢必加重育種工作之負荷。有鑑於此，除依循植物性狀選拔之傳統育種法外，實必要建立新有效之指標，以期輔助日益繁重的雜交與選拔工作。

近二十年來，分子生物分析技術發展神速，不但操作方法日趨簡便，對於物種遺傳及鑑定的準確性也相對提高[28]。就植物遺傳分析與利用方面，儼然已成爲輔助育種選拔及品種鑑別上，一項有力的工具。從早期在蛋白質層次的同功異構酵素(isozyme)[23] 及DNA層次的RFLP (restriction fragment length polymorphism)[28] 分析；繼之發展的有RAPD (random amplified polymorphic DNA)[45, 46]，Microsatellite DNA (simple sequence repeat, SSR；或inter simple sequence repeat, ISSR) 以及AFLP(amplified fragment length polymorphism) 等分析技術[31]。唯利用同功異構酵素進行之遺傳分析，受限於可供標誌基因座較少，不若DNA分子層次分析之多型性高且穩定。故自Kary Mullis (1984) 開發聚合酵素連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)[12] 技術後，利用DNA層次的分子生物標誌，已廣泛被利用於：種原(品種)鑑定、植物育種後裔遺傳之評估[12]、種原演進的估測以及遺傳相似性等方面之探討。分子生物標誌遠較傳統以植物性狀辨識，更具準確與快速性[27]。1990年Welsh[45] 及William[46] 提出操作簡單的RAPD分析技術，利用7～10個核甘酸序列的逢機引子 (random primer) 直接與受測種原之DNA進行PCR反應，再藉由其反應產物之DNA多型性片段，即可快速獲得遺傳分析資料，可免除早期RFLP分析中，高度技術性與分析成本昂貴之缺失，因此提出後短短十年間，幾乎已成爲各種作物遺傳分析中，最簡便而有效的分子標誌之一，在糧食作物如：水稻[48]、大麥[9] 及小麥[39]、十字花科蔬菜[24, 26]、豆類[4]、甜瓜[37]、藜科作物[34]、根莖類作物（馬鈴薯[11]、芋[19]、甘藷[35]）、木本果樹（葡萄[14]、柑橘[7]、梨[30]、酪梨[15]、杏仁[1]）、草莓[10]、花卉作物（玫瑰[20]、菊花[47]、康乃馨[36]、蕙蘭屬 *Cymbidium*[29]）等，均利用其進行種原鑑別或特定基因之分析。新近甚至在藥用植物上，如人參 (*Panax ginseng*) 與花旗參 (*P. quinquefolium*) 種原，亦有利用RAPD進行採集來源與族群之分析[3]。此外，幾乎與RAPD分子標誌技術同期發展的微衛星DNA (microsatellite DNA) 分析，也是一種較簡單且有效率的種原分析方法。微衛星DNA分析可追溯至1984年Tautz等人首先在哺乳類動物的基因組上發現1～6個核甘酸重覆性短序列 (short tandem repeat)[41]，而後Condit[8] 及Wang[43] 等人又陸續提出，稱之爲simple sequence repeat (SSR)，已證明它同樣存在植物基因上，並具有明顯的多型性表現。1993年迄今，微衛星DNA分析已成功利用於水稻基因圖譜[2, 48]，大豆基因型研究[33] 及玉米的種原分析[40]。初期的微衛星DNA分析，係由各作物DNA資料庫中，搜尋出現頻度高的SSR序列，合成該引子，再針對特定作物進行PCR多型性分析。至1995年Kantety進一步提出無須完全比對基因序列的ISSR分析技術，利用於玉米遺傳歧異

度分析[22]。往後可以快速上手的ISSR分析技術，也相繼被利用作為種原遺傳背景探討或品種鑑定之工具。Charters以ISSR markers作為油菜栽培種之鑑別[6]；Blair等人以ISSR進行水稻栽培種間遺傳歧異性之分析[2]；Fang等人則以ISSR分子標誌探討柑橘族群之親緣性[13]；Lomboy等人利用ISSR作為近緣種的葡萄種原之分析[25]；Stepansky等人則同時利用ISSR與RAPD，進行甜瓜種間之分類與比較[37]；Ratnaparkhe等人則藉由ISSR標誌，作為小黎豆 (chick pea) 的抗鐮刀菌萎凋病 (*Fusarium wilt*) 基因之篩選[33]。比較ISSR分析產物的多型性DNA片段，係呈顯性 (dorminant) 表現，其PCR產物之多型性通常較高於RAPD分析者，故可望利用於遺傳背景較相近的種原材料，作為遺傳分析或品種間之鑑別。

因應多年生或幼年性較長之作物育種與選拔工作，宜加強研究有效的DNA分子層次之輔助選拔標誌(marker-assisted selection)[38]，作為育種親本遺傳歧異性探討，以發展利用於優良後裔之選拔。本試驗材料火鶴花亦屬多年生宿根花卉，自播種至開花選拔，動輒費時二～三年，故本研究目的擬利用ISSR及RAPD兩種分子標誌 ，進行育種親本間遺傳相似性分析，並作為栽培種間鑑別之利用與比較，期開發火鶴花雜交育種親本與後裔選種之分子標誌，加速優良雜交組合之獲得，以提升育種工作之效率。

材料與方法

一、植物材料

自農業試驗所『火鶴花育種』計畫中，選取主要作為雜交親本之30個栽培種，其中包含：切花品種25個，內有紅色花栽培種 'Tropical' 等6種，粉紅色 'Marian Seefurth' 等5種，橘紅色 'Nette' 等6種，白色 'Cuba' 及 'Fla-White'，鮭粉色 'Lydia' 及 'Anneke'，綠色 'Midori'，白花紅邊 'Fla-Exotic' 及 'Carnaval'，白花紅暈 'Fantasia'。另外，盆花品種4個，分別為白花紅暈 'Champion'，粉白色 'Lady Anne'，桃紅色 'Lady Jane'，暗紫紅色 'Southern Blush'，及切花、盆花兩用品種 'Acropolis' (表1)。

以上提供作為試驗採樣與調查之植株，均為二年生以上之成熟開花植株。

二、DNA萃取

DNA萃取方法參考Iqbal[18]，取植株嫩葉0.2公克加入液態氮磨碎，加入1 ml的DNA萃取緩衝液 (2%(w/v) CTAB ， 100 mM Tris-HCl ， pH 8.0; 20 mM EDTA ； 1.4 M NaCl ; 1.0%polyvinyl polypyrolidone; 1.0%(v/v) β-mercaptoethanol)，再放入60℃水浴30分鐘，輕輕混勻後加入500 μ l chloroform-isoamyl alcohol (24 ： 1 , v/v)，混合均勻，在4℃以14,000rpm 離心10分鐘。取上清液加入500 μ l之冰冷isopropanol，混合均勻後放置在室溫下沉澱1~2小時(或 -20℃，隔夜)。再離心去上清液，再加入1 ml之washing buffer (76% ethanol (v/v); 10 mM ammonium acetate) 輕輕混勻後，再於4℃下以14,000 rpm離心10分鐘，再去上清液將沉澱的DNA置於冷凍乾燥機吹乾。將凍乾之DNA沉澱溶於50 μ l的無菌水，再加入RNase (10 μ g/ml) 在37℃下反應20分鐘。最後取10 μ l的DNA溶液，稀釋100倍並測定OD 260 nm之讀值，及計算DNA含量濃度。

三、聚合酵素連鎖反應 (PCR)

(一) RAPD分析

將萃取得之genomic DNA稀釋成5 ng/μ l放置在 -20℃下，提供聚合酵素連鎖反應時，作為模板DNA。使用Operon Kit：B、C、F、G、J，共100種引子，經初步試驗結果，由PCR產物中篩選出多型性明顯的引子7個：OPB4、OPB14、OPC8、OPF6、OPG17、OPG18、OPJ14，進行30個栽培品種的聚合酵素連鎖反應。反應液總體積為25 μ l，內含1 u Taq polymerase (Promega)、1×PCR buffer (50 mM KCl ； 10 mM Tris-HCl ，pH 9.0 ； 0.1% Triton 100)、2.5 mM $MgCl_2$、200 μ M dNTP、0.2 μ M primer及50 ng template DNA 。聚合酵素連鎖反應儀器為 Perkin Elmer Cetus Thermal Cycler 9600，反應溫度條件設定如下： 94℃ 3分鐘， 40℃ 1分鐘， 72℃ 1分鐘；再進行43 次的94℃ 1 分

表1. 火鶴花栽培種及其特性

Table 1. List of *Anthurium* cultivars and their characters

No.	Cultivars	Spathe color	Spadix color	Stem color	Origin
1	302	Red	Yellow	Green	Unknown
2	304	Dark-red	Yellow	Green	Unknown
3	Atlantis	Red	Yellow-green	Red-green	Unknown
4	Fla-Success	Red	Yellow	Green	Flamingo (Netherlands)
5	Alexis	Red	Yellow	Green	AVO (Netherlands)
6	Tropical	Red	Yellow-green	Green	Anthura (Netherlands)
7	Tropical-P	Dark-pink	Green	Green	Mutant from Tropical
8	Marian Seefurthh	Pink	Yellow	Green	(Hawaii University)
9	Lydia	Salmon-pink	Salmon-pink	Red	AVO
10	Anneke	Salmon-pink	Yellow	Red-green	AVO (Netherlands)
11	Lunette	Light-pink	Pink	Red	AVO (Netherlands)
12	*Anthurium* Midori	Green	Green	Dark-green	Anthura (Netherlands)
13	Fantasia	White/Red vein	Dark-red	Green	Anthura (Netherlands)
14	Trinidad?	Pink	Pink-purple	Green	USA (Hawaii ?)
15	81-11	Orange	Yellow	Red	Unknown
16	AVO-Nette	Orange	Yellow	Red	AVO (Netherlands)
17	76-06	Orange	Yellow	Red	Unknown
18	78-21	Orange	Yellow	Red	Unknown
19	Fla-Range	Orange	Yellow	Green	Flamingo (Netherlands)
20	Fla-Mingo	Orange	Yellow	Green	Flamingo (Netherlands)
21	Acropolis	White	Yellow	Green	Anthura (Netherlands)
22	Cuba	White	Green	Green	Anthura (Netherlands)
23	Fla-White	White	Green	Green	Flamingo (Netherlands)
24	Fla-Exotic	White/Red border	Yellow	Red	Flamingo (Netherlands)
25	Carnaval	White/Red border	Green-yellow	Red	Anthura (Netherlands)
26	Asahi	Light pink	Yellow-red	Red	Hawaii
27	Champion	White/Red vein	Red	Green	Anthura (Netherlands)
28	Lady Anne	White-pink	Pink	Green	USA (Florida)
29	Lady Jane	Dark pink	Dark pink	Green	USA (Florida)
30	Southern Blush	Dark Purple-pink	Dark Red	Red	Henny (Florida)

鐘，40℃ 1分鐘，72℃ 2分鐘；最後72℃ 5分鐘。反應完成後貯藏在4℃。

(二) ISSR分析

ISSR分析之DNA量與反應液體積濃度與RAPD分析相同，唯ISSR反應用引子則取自UBC Kit9的ISSR primers，共計100條。經初步試驗篩選出7個多型性明顯的引子：UBC812、UBC824、UBC852、UBC853、UBC854、UBC856、UBC859，進行30個栽培品種的聚合酵素連鎖反應，反應儀器與RAPD分析相同，反應溫度則設定爲：94℃ 3分鐘，55℃ 1分鐘，72℃ 1分鐘；再進行43次的94℃ 1分鐘，55℃ 1分鐘，72℃ 2分鐘；最後72℃ 5分鐘。反應完成仍貯藏在4℃。

四、DNA電泳

經聚合酵素連鎖反應而增殖之DNA，取12 μl加入6倍的電泳緩衝液 (6 × loading buffer：0.25%

bromophenol blue及xylene cyanol，40% w/v sucrose)，唯RAPD分析係以2.0%的agarose在TAE buffer (40 mM Tris acetate，pH 8.0；1 mM EDTA) 中進行電泳，ISSR分析之電泳緩衝液則爲TBE。電泳槽均爲Cosmo, Mupid-2，電壓100伏特，電泳時間約25～30分鐘，結束後置於0.5 mg/ml的ethidium bromide中染色20-30分鐘，再於UV光箱中，檢視膠體上DNA多型性片段，並照相及貯存影像於IS 2000 Digital Imaging System (Alpha Innotech Corporation)，以進一步進行資料分析。

五、資料分析

群集分析是採用Gel-Compar軟體，計算ISSR或RAPD分析中兩兩品系間相同條帶的比率。所有樣品經兩兩分析後，以UPGMA (Unweighted Pair-Grouping Mean Arithmetical) 估算相似性程度。PCR產物的DNA片段係以Bio100 DNA Ladder(3000bp~100bp) 估算其分子量，並以Jaccard's相似性係數分析。相似性係數值 (simple matching coefficient)的計算方式爲F = nxy / (nx+ny) - nxy 。nx及ny分別代表X及Y品系的所有多型性DNA片段，nxy則表示X及Y品系間都共有的片段數。以上資料於個人電腦中以Gel-Compar軟體進行UPGMA群體分析，並用以估算品系間相似性係數 (similarity coefficient)。

結　果

一、RAPD分子標誌與栽培種之鑑別

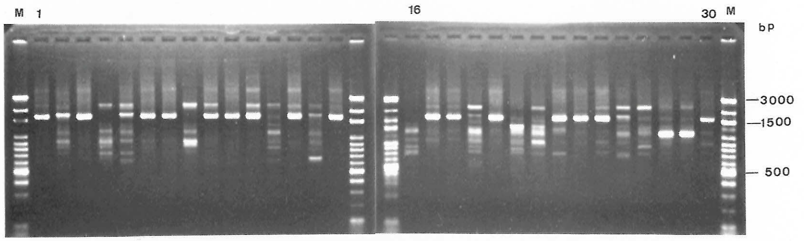
經由篩選OPERON逢機引子組 (Kit B, C, F, G, J) 5組，共100條引子，選出PCR產物多型性表現最高，且多型性DNA條帶清晰者，計7條引子：OP-B04，OP-B14（圖1），OP-C08, OP-F06, OP-G17（圖2），OP-G18, OP-J14，並以此7條引子分別再與30個栽培種進行PCR反應。反應結果，7條RAPD引子總計產生134個擴增之DNA片段，其中131個爲多型性DNA片段，而獲得之片段大小，則介於270bp至4,000bp。綜合平均每個引子反應產物約獲得18個RAPD片段，其中17個具多型性（表2）。

以引子OP-J14進行PCR反應結果，獲得最多之多型性DNA片段，在28個多型性片段中有6個特定片段（表2），可提供作爲 ‘304’、‘Fla-Success’、‘Alexis’、‘Nette’ 及 ‘Lady Jane’ 等5個栽培種（表3）鑑別之用。而引子OP-B14進行之PCR，則可獲得最多之品種標誌片段，在21個多型性片段中，有9個特定條帶之RAPD片段，可用以鑑別 ‘Alexis’、‘Marian Seefurth’、‘Trinnidad’、‘Fla-Range’、‘Acropolis’、‘Cuba’、‘Fla-White’ 及 ‘Asahi’等8個栽培種（圖1、表3)。此外，OP-B04經PCR反應結果獲得20個多型性DNA片段，其中4個RAPD片段爲品種標誌之特定條帶，可用以鑑別‘Acropolis’、

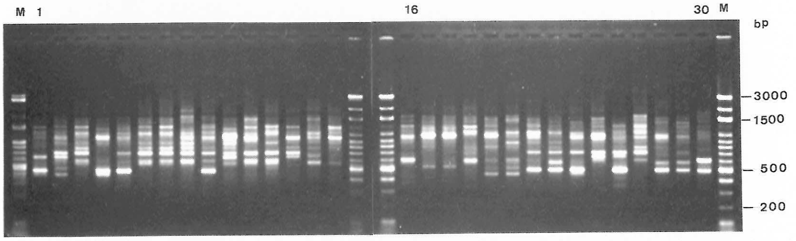
表2. 火鶴花RAPD分析中具多型性之引子及其多型性特性

Table 2. Characteristics of polymorphic RAPD primers for *Anthurium*

Primers	Sequence 5’ to 3’	Product size (bp)	No. of fragments	Polymorphic fragments fragments	Specific fragments for identification
OP-B04	GGACTGGAGT	2,270~270	22	20	4
OP-B14	TCCGCTCTGG	4,000~630	21	21	9
OP-C08	TGGACCGGTG	2,790~690	6	6	3
OP-F06	GGGAATTCGG	3,270~490	24	24	3
OP-G17	ACGACCGACA	2,000~430	27	27	7
OP-G18	GGCTCATGTG	885~560	6	5	2
OP-J14	CACCCGGATG	2,300~330	28	28	6
Total bands			134	131	34
Average			18	17	



(A)

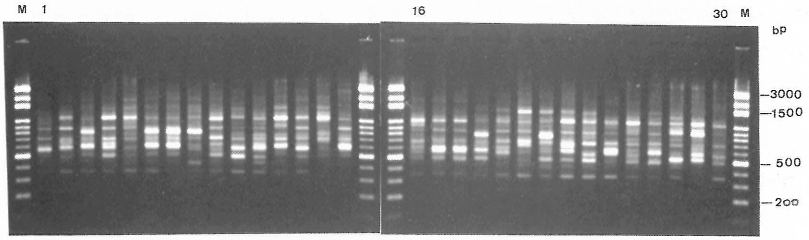


(B)

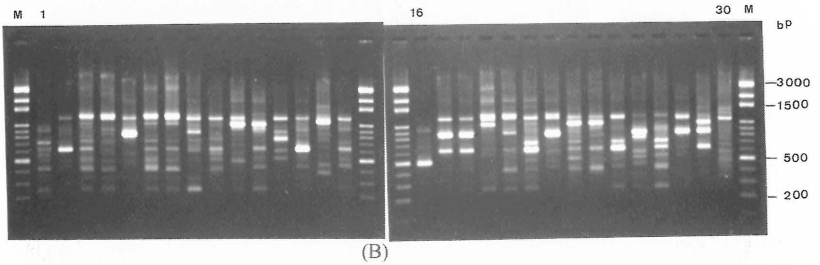
圖1. 火鶴花30栽培種(詳見表1)之RAPD圖譜。

Fig.1. RAPD profiles generated by 2 primers (A ： OP-B14 、 B ： OP-G17) and resolved by 2.0% agarose gel. M ： molecular marker (Bio100 DNA Ladder).

The sequence and cultivar name for each lane was shown in Table 1.



(A)



(B)

圖2. 火鶴花30栽培種(詳見表1)之ISSR圖譜。

Fig.2. ISSR profiles generated by 2 primers (A ： UBC-812 、 B ： UBC-852) and resolved by 2.0% agarose gel. M ： molecular marker (Bio100 DNA Ladder).

The sequence and cultivar name for each lane was shown in Table 1.

表3. 火鶴花各栽培種鑑定之特定RAPD標誌片段

Table 3. Specific RAPD markers for some cultivars of *Athurium*

Cultivars	Primers (specific fragment / bp)
302	OP-G17 (470)
304	OP-G17 (740)、OP-J14 (1,870)
Fla-Success	OP-J14 (330)
Alexis	OP-B14 (630)、OP-J14 (505)
Marian Seefurth	OP-B14 (870)、OP-G17 (2,000 ; 1,705)
Lydia	OP-F06 (490)
Lunette	OP-G17 (1,550)
Midori	OP-F06 (3,270)
Trinnidad	OP-B14 (685)、OP-G18 (710)
AVO-Nette	OP-G17 (1,400)、OP-J14 (720)
Fla-Range	OP-B14 (1,480)
Acropolis	OP-B04 (790)、OP-B14 (910 ; 790)
Cuba	OP-B14 (2,215)
Fla-White	OP-B14 (1,250)
Fla-Exotic	OP-B04 (490)
Asahi	OP-B14 (690)
Champion	OP-B04 (550)、OP-C08 (2,790 ; 1,725 ; 790)
Lady Jane	OP-F06 (1,135)、OP-G18 (885)、OP-J14 (600 ; 450)
Southern Blush	OP-B04 (910)

‘Fla-Exotic’、‘Champion’ 及 ‘Southern Blush’ 等4個栽培種（表3）。OP-C08引子反應結果僅獲得之6個多型性DNA片段，其中3個RAPD片段爲品種標誌之特定條帶，僅用以鑑別 ‘Champion’（表3）。OP-F06引子反應結果獲得24個多型性DNA片段，其中3個可用以鑑別 ‘Lydia’、‘Midori’ 及 ‘Lady Jane’ 等3個栽培種（表3）。OP-G17反應結果獲得27個多型性DNA片段，其中7個可用以鑑別 ‘302’、‘304’、‘Marian Seefurth’、‘Lunette’ 及 ‘Nette’ 等5個栽培種（圖1、表3）。OP-G18引子反應結果亦僅獲得6個多型性DNA片段，其中5個RAPD片段爲品種標誌之特定條帶，可用以鑑別 ‘Trinnidad’ 及 ‘Lady Jane’2個栽培種（表3）。綜合7條RAPD引子可篩檢得34個品種標誌用特定條帶，用以鑑別19個栽培品種（表3）。

二、ISSR分子標誌與栽培種之鑑別

自UBC Kit9/ISSR primers 100條引子，篩選出7個多型性高之引子：UBC812、UBC824、UBC852、UBC853、UBC854、UBC856、UBC859，其中UBC824、UBC852、UBC853及UBC854均爲dinucleotides motif : $(TC)_n$。進一步將上述7個ISSR引子與30個栽培種進行PCR反應結果，共產生159個擴增之DNA片段，其中153個爲多型性，片段大小則介於370bp至3,020bp，統計平均每個引子PCR反應約可產生23個ISSR片段，其中22個具有多型性（表4）。以引子UBC-852進行PCR反應結果，可獲得數量最多之ISSR片段，計34個多型性片段，其中具11個特定片段（圖2、表4），可提供作爲 ‘302’、‘Atlantis’、‘Anneke’、‘Trinnidad’、‘Fla-Range’、‘Fla-Exotic’、‘Fla-White’、‘Lady Jane’、及 ‘Southern Blush’ 等9個栽培種鑑別之用。此外，以引子UBC-812反應結果（圖2），獲得19個多型性ISSR片段，其中4個片段爲品種標誌之特定條帶，可用以鑑別 ‘Alexis’、‘Marian Seefurth’、‘Champion’ 及 ‘Lady Anne’ 等4個栽培種。以引子UBC-824進行反應，獲得22個多型性ISSR片段，其中5個片段爲品種標誌之特定條帶，可用以鑑別 ‘81-11’、‘Acropolis’ 及 ‘Fla-White’ 等3個栽培種。UBC-853反應結果，獲得24個多型性DNA片段，其中3個可用以鑑別 ‘Lydia’、‘Midori’ 及 ‘Lady Jane’

表4. 火鶴花ISSR分析中具多型性之引子及其多型性特性

Table 4. Characteristics of polymorphic ISSR primer for *Anthurium*

Primers	Sequence 5' to 3'	Product size (bp)	No. of fragments	Polymorphic fragments fragments	Specific fragments for identification
UBC-812	GAGAGAGAGAGAGAGAA	1,890~370	21	19	4
UBC-824	TCTCTCTCTCTCTCTCG	2,010~400	22	22	5
UBC-852	TCTCTCTCTCTCTCTCRA	2,970~260	34	34	11
UBC-853	TCTCTCTCTCTCTCTCRT	2,010~470	24	22	3
UBC-854	TCTCTCTCTCTCTCTCRG	2,080~360	22	22	2
UBC-856	ACACACACACACACACYA	3,020~430	24	24	2
UBC-859	TGTGTGTGTGTGTGTGRC	1,840~490	12	10	4
Total bands			159	153	32
Average			23	22	

' "R" stands for purine, and "Y" for pyrimidine.

等3個栽培種。以UBC-854反應結果，獲得22個多型性DNA片段，其中2個多型性DNA片段可用以鑑別 'Champion' 及 'Southern Blush' 等2個栽培種。引子UBC-856反應結果，獲得24個多型性ISSR片段，其中2個片段爲品種標誌之特定條帶，可用以鑑別 'Asahi' 及 'Southern Blush' 等2個栽培種。UBC-859引子反應結果，僅獲得之10個多型性DNA片段，其中4個ISSR片段爲品種標誌之特定條帶，用以鑑別 'Lunette'、'Fantasia'、'Lady Anne' 及 'Southern Blush' 等4個栽培種。綜合7條ISSR引子之PCR反應結果，計篩檢得32個品種標誌用之特定片段，可用以鑑別18個栽培品種。（表4、表5）

表5. 火鶴花各栽培種鑑定之特定ISSR標誌片段

Table 5. Cultivar specific ISSR markers of *Athurium*

Cultivars	Primers (specific fragment / bp)
302	UBC-852 (560 ； 380)
Atlantis	UBC-852 (980)
Alexis	UBC-812 (1,890)
Marian Seefurth	UBC-812 (440)
Anneke	UBC-852 (690)
Lunette	UBC-859 (1,840)
Fantasia	UBC-859 (640)
Trinnidad	UBC-852 (400)
81-11	UBC-824 (410)
Fla-Range	UBC-852 (2,970)、UBC-853 (590)
Acropolis	UBC-824 (2,010)
Fla-White	UBC-824 (780 ； 490 ； 440)、UBC-852 (340)
Fla-Exotic	UBC-852 (880)
Asahi	UBC-856 (3,020)
Champion	UBC-812 (490)、UBC-854 (2,080)
Lady Anne	UBC-812 (1,250)、UBC-853 (560)、UBC-859 (1,420)
Lady Jane	UBC-852 (1,450)
Southern Blush	UBC-852 (1,390 ； 660)、UBC-853 (470)、UBC-854 (900) UBC-856(620)、UBC-859 (1,130)

三、ISSR及RAPD分子標誌在栽培種間遺傳相似性之分析與比較

將篩選得之7條ISSR引子其PCR反應之總反應產物159個片段，合併進行UPGMA (unweighted pair-group mean arithmetic) 群集分析，並以Jaccard's相似性係數分析，估算品系間相似性係數(similarity coefficient)，進一步再以『相似性係數矩陣』(similarity coefficient matrix) 構築相似性樹狀圖(dendiagram)結果：30個栽培種可分成四個主要群組，除品種差異性較大的 'Southern Blush'、'Fla-range' 及 'Lady Anne'，成爲個別獨立的三群外；最大之第四群組則包含27個栽培種，並可進一步細分成4個亞群組，其中第三亞群組含6個栽培種 'Lunette'、'Cuba'、'Alexis'、'Fla-Mingo'、'76-06'、'78-21' 及 'AVO-Nette'，均屬切花品種，其間並具有較高之遺傳相似性（相似性係數0.71），唯連鎖四群集的30個栽培種間，以ISSR分析之遺傳相似性係數達0.53。（圖3）

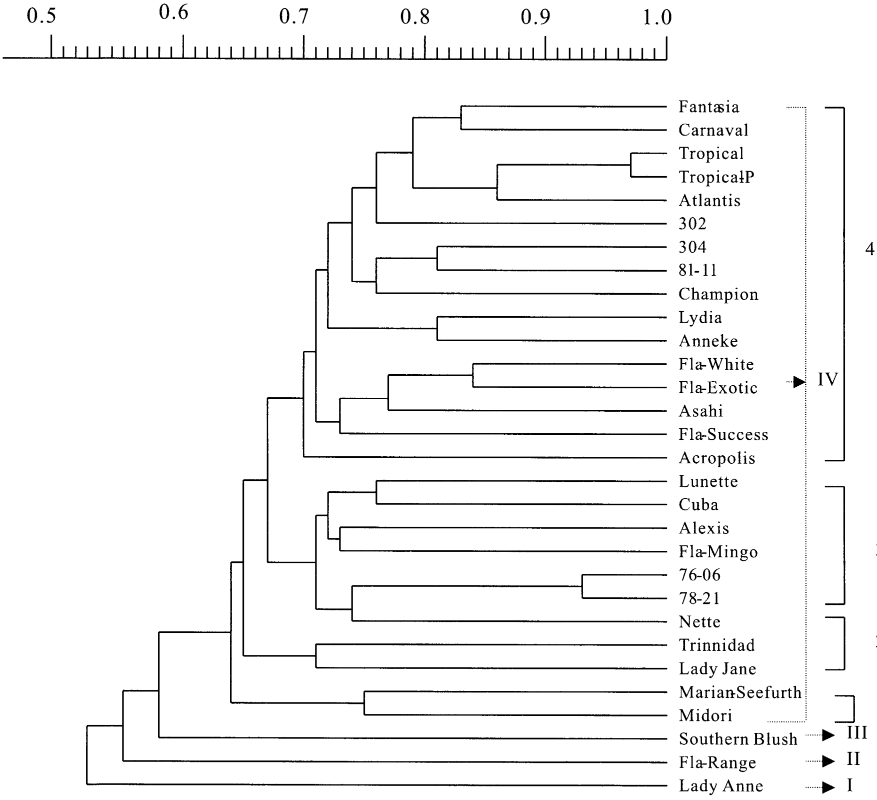


圖3. 火鶴花30個栽培種之ISSR圖譜，經UPGMA Jaccard's計算之相似性樹狀圖。

Fig.3. Dendrogram illustrating genetic relationship among 30 cultivars of *Anthurium*, generated by UPGMA cluster analysis calculated from 159 ISSR markers produced by seven primers. The scale on the top is Jaccard's coefficient of similarity.

在RAPD分析方面，其總反應產物爲134個片段，經合併進行 UPGMA分析結果也分成四個主要群組：第一群 'Southern Blush'；第二群 'Champion' 及 'Marian Seefurth'；第三群 'Midori'；第四群組包含26個栽培種，又可進一步細分成2個亞群組，其中第一亞群亦爲品種相似性較高之16個切花品種，其間相似性係數0.64，第二亞群則包含2個盆花品種 'Lady Anne'、'Lady Jane'、盆切花兩用 'Acropolis' 及其他切花品種7個，計10個栽培種間相似性係數0.61。唯連鎖四群集的30個栽培種間，

以RAPD分析之遺傳相似性係數達0.57。（圖4）

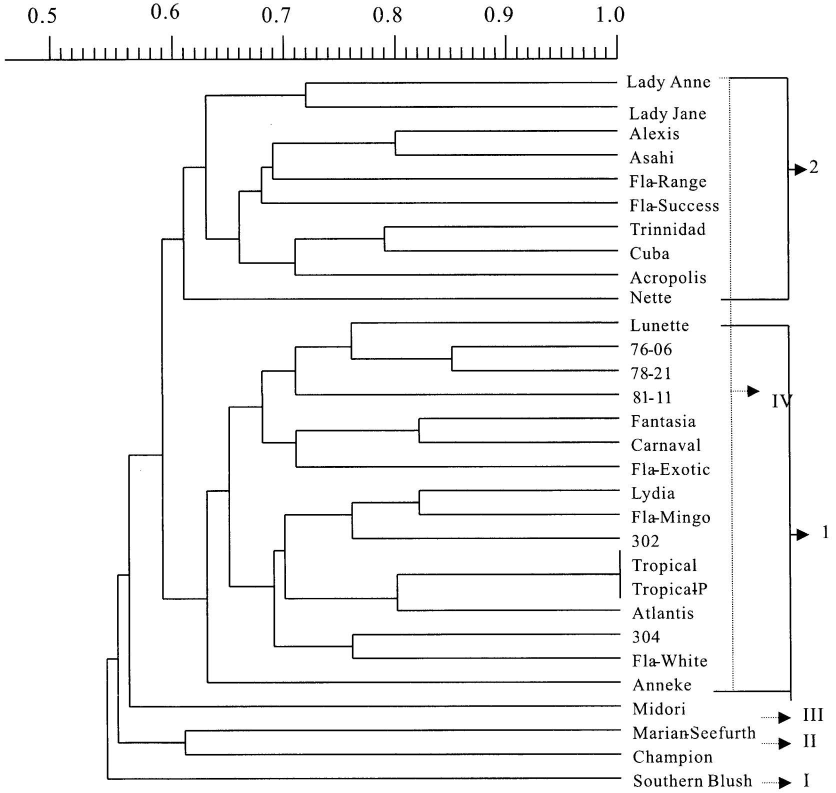


圖4. 火鶴花30個栽培種之RAPD圖譜，經UPGMA Jaccard's計算之相似性樹狀圖。

Fig.4. Dendrogram illustrating genetic relationship among 30 cultivars of *Anthurium*, generated by UPGMA cluster analysis calculated from 134 RAPD markers produced by seven primers. The scale on the top is Jaccard's coefficient of similarity.

綜合以上ISSR及RAPD分析試驗結果顯示，兩分子標誌在火鶴花栽培種間之遺傳相似性分析，具有相近之結果。整體而言，切花品種之相似性明顯高於盆花品種，唯切花品種中‘Marian Seefurth’、‘Midori’不論以ISSR或RAPD分析結果，均明顯相異於其他切花；盆花品種方面，則均以‘Southern Blush’之品種相似性較低。（圖3、圖4）

討　論

對於作爲遺傳分析之輔助選拔標誌 (marker-assisted selection, MAS) 而言，最好兼具有快速、穩定性高（再現性高）及分辨力強等三方面特質。而自1990年代發展迄今的RAPD與ISSR兩種分子標誌技術，似乎都是理想的MAS分析工具之一。唯近三年來，國際間不少的相關報告，著眼於RAPD與ISSR之分析與比較，其中多數研究結果仍傾向支持RAPD與ISSR同樣適用於種原遺傳分析之利用，並視爲兼具快速而有效之篩選標誌，唯ISSR可獲得較多之多型性基因座，能提供部分親緣性更相近的“種”進行鑑別之用[2, 31, 37]。而本試驗中ISSR與RAPD分子標誌在火鶴花遺傳相似性分析結果相近，與

前人之研究實有相同之觀點。

唯本研究中以ISSR分析結果，發現dinucleotides motif作爲引子獲得之多型性最高，而篩選得多型性最高的7個引子一致全部爲dinucleotides motif，尤其值得注意的是，歸納獲選的7個火鶴花ISSR引子，發現爲$(TC)_n$序列者竟佔4個之多，相較之下其他同時測試篩檢的trinucleotides motif、tetra-nucleotides motif、pentanucleotides motif或不存在或不具多型性表現，此與前人研究報告中提出之結果，亦有相似之處。如Ratnaparkhe等人 (1998) 在利用ISSR進行小藜豆抗病基因篩選研究中，曾發現dinucleotides motif: $(GA)_n$及$(TG)_n$大量存在其基因內，其中$(AC)_n$更與小藜豆抗青枯病病基因具關連性。另外，Blair等人 (1999) 在進行水稻基因的microsatellite DNA研究時，也發現dinucleotides motif較其他tri-,tetra-及pentanucleotides motif有較高之表現，其中並以$(GA)_n$大量存在水稻基因中。故鑑於$(TC)_n$明顯大量存在於火鶴花基因內之事實，値得進一步利用此microsatellite DNA序列，設計一系列的ISSR分析用引子，以輔助未來進行更多的火鶴花遺傳相關性之研究。藉由對育種親本之遺傳背景有深入的探討及瞭解，必能助益於未來育種工作中新雜交組合的選擇，加速優良雜交後裔之獲得，此對於提升火鶴花育種效率，將具有實用之價值。

引用文獻

1. Bartolozzi, F., M. L. Warburton, S. Arulsekar , and T. M. Gradziel. 1998. Genetic characterization and relatedness among California almond cultivars and breeding lines detected by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 123(3): 381-387.
2. Blair, M. W., O. Panaud, and S.R. McCouch. 1999. Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerfrinting in rice (*Oryza sativa* L.). Theor. Appl. Genet. 98:780-792.
3. Boehm, C.L., H.C. Harrison, G. Jung, and J. Nienhuis. 1999. Organization of American and Asian ginseng germplasm using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 124(3):252-256
4. Briand, L., A. E. Brown , J. M. Lenne, and D. M. Teverson. 1998. Randomly amplified polymorphic DNA variation within and among bean landrace mixtures (*Phaseolus vulgaris* L.) from Tanzania. Euphytica 102:371-377.
5. Cao, W. , P. Hucl , G. Scoles, and R. N. Chibbar. 1998. Genetic diversity within apelta and macha wheats based on RAPD analysis. Euphytica 104:181-189.
6. Charterers, Y.M., A. Robertson, M.J. Wilkinson, and G. Ramsay. 1996. PCR analysis of oilseed rape cultivars (*Brassica napus* L. ssp. *oleifera*) using 5' -anchored simple sequence repeat (SSR) primers. Theor. Appl. Genet. 92:442-447.
7. Coletta, Filho, H. D., M. A. Machado, M.L.P.N. Targon, M.C. P.Q.D.G. Moreira , and J. Pompeu Jr. 1998. Analysis of the genetic diversity among mandarins (*Citrus* spp.) using RAPD markers. Euphytica 102:133-139.
8. Condit, R., and S.P. Hubbell. 1991. Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes. Genome, 34: 66-71
9. De Bustos, A., C. Casanova, C. Soler , and N. Jouve. 1998. RAPD variation in wild populations of four species of the genus *Hordeum* (*Poaceae*). Theor Appl Genet. 96:101-111.
10. Degani, C., L. J. Rowland, A. Levi, J. A. Hortynski , and G. J. Galletta. 1998. DNA fingerprinting of strawberry (*Fragaria* x *ananassa*) cultivars using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Euphytica 102:247-253.
11. Demoke, T., D. R. Lynch, L.M. Kawchuk, G. C. Kozub, and J. D. Armstrong. 1996. Genetic diversity of potato determined by random amplified polymorphic DNA analysis. Plant Cell Rep. 15:662-667.
12. Erlich, H. A.. 1989. PCR technology. pp 246. Stockton Press. New York.
13. Fang, D., R.R. Krueger, and M. L. Roose. 1998. Phylogenetic relationships among selected *Citrus* germplasm accessions revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 123(4): 612-617.
14. Fanizza, G., G. Colonna, P. Resta, and G. Ferrara. 1999. The effect of the number of RAPD markers on the evaluation of genotypic distances in *Vitis vinifera*. Euphytica 107:45-50.
15. Fielder, J., G. Bufler , and F. Bamgerth. 1998. Genetic relationships of avocado (*Persea americana* Mill.) using RAPD markers. Euphytica 101:249-255.

16. Henny, R. J., R.T. Poole, and C.A. Connover. 1988. 'Southern Blush' A hybrid *Anthurium* for floiage producers. Circular, Agriculture Experiment Station, No.S-350 . pp.4. University of Florida.

17. Henny, R. J., R.T. Poole, and C.A. Connover. 1988. "Southern Blush" *Anthurium* . Hortscience. 23(5)：922-923.

18. Iqbal, M.J., D.W. Paden and A. L. Rayburn. 1995. Assessment of genetic relationships among rhododendron species, varieties and hybrids by RAPD analysis. Sci. Hort. 63:215-223.

19. Irwin, S.V., P. Kaufusi, K. Banks, R. de la Pena , and J.J. Cho. 1998. Molecular characterization of taro (*Colocasia esculenta*) using RAPD markers. Euphytica 99:183-189.

20. Jan, C.H., and D. H. Byrne. 1999. Roose germplasm analysis with RAPD markers. HortScience 34(2): 341-345.

21. Kamemoto, H. and A. R. Kuehnle. 1996. Breeding *Anthuriums* in Hawaii. pp.132. University of Hawaii Press.

22. Kantety R.V., X. Zeng, J.L. Bennetzen, and B.E. Zehr. 1995. Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification. Mol. Breed. 1: 365-373.

23. Kobayashi R. S., J. L. Brewbaker , and H. Kamemoto. 1987. Identification of *Anthurium andraeanum* cultivars by gel electrophoresis. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 112(1): 164-167.

24. Kresovich, S., J. G. K. Williams, J. R. McFerson, E. J. Routman, and B. A. Schaal. 1992. Characterization of genetic identities and relationships of *Brassica oleracea* L. via a random amplified polymorphic DNA assay. Theor. Appl. Genet. 85:190-196.

25. Lomboy W.F., and C. G. Alpha. 1998. Using simple sequence repeat (SSRs) for DNA fingerprinting germplasm accessions of grape (*Vitis* L.) species. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 123(2): 182-188.

26. Mailer, R. J., R. Scarth, and B. Fristensky. 1994. Discrimination among cultivars of rapeseed (*Brassica napus* L.) using DNA polymorphisms amplified from arbitrary primers. Theor. Appl. Genet. 87: 697-704.

27. Nicese, F.R., J.I. Hormaza, and G.H. McGranahan. 1998. Molecular characterization and genetic relatedness among walnut (*Juglans regia* L.) genotype based on RAPD markers. Euphytica 101:199-206.

28. Oard, J. H., and S. Dronavalli. 1992. Rapid isolation of rice and maize DNA for analysis by random-primer PCR. Plant Mol. Bio. Rep. 10:236-241.

29. Obara-Okeyo, P., and S. Kako. 1998. Genetic diversity and identification of *Cymbidium* cultivars as measured by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Euphytica 99:95-101.

30. Oliveira, C.M., M. Mota, L. Monte-Corvo, L. Goulao, and D.M. Silva. 1999. Molecular typing of Pyrus based on RAPD markers. Sci. Hort. 79:163-174.

31. Pejic, I., P. Ajmone-Marsan, M. Morgante, V. Kozumplick, P. Castiglioni, G. Taramino, and M. Motto. 1998. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs, and AFLPs. Theor. Appl. Genet. 97:1248-1255.

32. Ratnaparkhe M.B., D.K. Santra, A. Tullu, and F.J. Muehlbauer. 1998. Inheritance of inter-simple-sequence-repeat polymorphisms and linkage with a fusarium wilt resistance gene in chickpea. Theor. Appl. Genet. 96:348-353.

33. Rongwen J., M.S. Akkaya, and A.A. Bhagwat. 1995. The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. Theor. Appl. Genet. 90:43-48.

34. Ruas, P. M., A. Bonifacio, C. F. Ruas, D. J. Fairbanks, and W. R. Andersen. 1999. Genetic relationship among 19 accessions of six species of *Chenopodium* L., by random amplified polymorphic DNA fragments (RAPD). Euphytica 105:25-32.

35. Sagredo, B., P. Hinrichsen , H. Lopez ,A. Cubillos , and C. Munoz. 1998. Genetic variation of sweet potatoes (*Ipomoea batatas* L.) cultivated in Chile determined by RAPDs. Euphytica 101:193-198.

36. Scovel, G., H. Ben-Meir, M. Ocadis, H. Itzhaki, and A. Vainsein. 1998. RAPD and RFLP markers tightly linked to the locus controlling carnation (*Dianthus caryophyllus*) flower type. Theor. Appl. Genet. 96:117-122.

37. Stepansky A., I. Kovalski, and R. Perl-Treves. 1999. Intraspecific classification of melons (*Cucumis melo* L.) in view of their phenotypic and molecular variation. Plant Syst. Evol. 217:313-332.

38. Staub, J.E., and F. C. Serquen. 1996. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. HortScience 31(5): 729-741.

39. Sun, Q., Z. Ni, Z. Liu, J. Gao, and T. Huang. 1998. Genetic relationships and diversity among Tibetan wheat, common wheat and European spelt wheat revealed by RAPD markers. Euphytica 99:205-211.

40. Taramino T.,and S. Tingey. 1996. Simple sequence repeats for germplasm analysis and mapping in maize. Genome, 39:227-287.

41. Tautz, D.,and M. Renz. 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. Nucleic Acids Res. 12:4127-4138

42. Van Uffelen, A. 1996. Creative flower arranging with *Anthurium*. pp95. Kosmos-Z&K Publishers. Holland.

43. Wang, Z., J.L. Weber, G. Zhong, and S.D. Tanksley. 1994. Survey of plant short tandem DNA repeats. Theor. Appl. Genet. 88:1-6.

44. Wannakrairoj, S. and H. Kamemoto. 1990. Inheritance of purple spathe in *Anthurium*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 115(1): 169-171.

45. Welsh, J. and M. McClelland. 1991. Genomic fingerprinting using arbitrarily primer PCR and a matrix of pairwise combinations of primers. Nucleic Acids Res. 19: 5275-5279.

46. Williams, J. G., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski, and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18:6531-6535.

47. Wollf, K., E. Zeitkiewicz, and H. Hofstra. 1995. Identification of chrysanthemum cultivars and stability of DNA fingerprint patterns. Theor. Appl. Genet. 91:439-447.

48. Wu, K.S., and S.D. Tanksley. 1993. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellite in rice. Mol. Gen. Genet, 241:225-235.

Comparative Analysis of Genetic Similarity among *Anthurium* Cultivars by Using ISSR and RAPD Markers [1]

Jau -Yueh Wang [2], Keng-Chang Chuang[3] and Ming- Jen Fan [4]

Summary

Thirty *Anthurium* cultivars in the breeding program of Taiwan Agriculture Research Institute were evaluated and compared by using ISSR (inter simple sequence repeat) and RAPD (random amplified polymorphic DNA) molecular markers. Objectives were to assess genetic similarity within the cultivars and survey the identification markers. The results indicated both methods revealed high degree of genetic polymorphism. The result of ISSR suggested that among the dinucleotides motifs, the poly$(TC)_n$ motif was more abundant and gave the largest number of polymorphism. There were 153 polymorphic bands produced by seven selected primers using ISSR analysis while 131 polymorphic bands were produced by RAPD. Additionally, 32 specific DNA fragments derived from ISSR analysis that could be used to distinguish 18 cultivars while 34 DNA fragments derived from RAPD analysis were used to distinguish 19 cultivars. Furthermore, analysis of genetic similarity by UPGMA (Un-weighted Pair-group Mean Arithmetic) using the markers of ISSR and RAPD revealed both were closely related. In the ISSR analysis, a dendrogram based on the UPGMA cluster analysis was constructed using the similarity matrix that derived from 159 polymorphic ISSR fragments generated by seven primers. These thirty cultivars could be divided into four major groups ： The cultivars of 'Southern Blush' 、 'Fla-range' and 'Lady Anne' performed as three independent groups that appeared to be distinct from other cultivars of group four. The similarity coefficient calculated from thirty cultivars analysis by ISSR was 0.529. In the RAPD analysis, a dendrogram also constructed using UPGMA from 134 fragments that were amplified by seven selected primers, divided the thirty cultivars into four main groups ： 1) 'Southern Blush' 2) 'Champion' and 'Marian-Seefurth' 3) 'Midori' that seems to be distinct from other cultivars of group forth too. The similarity coefficient calculated from all thirty cultivars analysis by RAPD was 0.57. It is suggested both ISSR and RAPD markers are useful in current breeding program of *Anthurium*, and allowed to estimate the genetic similarity among genotypes as well as to identify cultivars. These quick and reliable molecular tools are useful in selecting the best parents and obtaining new combinations.

Key words ： *Anthurium* , Breeding, ISSR, RAPD, Identification, Genetic similarity.

---

1. Contribution No. 2058 from Taiwan Agriculture Research Institute, Council of Agriculture.

2. Respectively, Assistant Researcher, Senior Researcher and Head, Crop Genetic Resources Laboratory, TARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.

3.Assistant Horticulturist, Department of Horticulture, TARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.